

胰岛素样生长因子-Ⅱ对大鼠脑缺血再灌注损伤后 NSE 含量变化影响

Insulin-like Growth Factor-Ⅱ Effects on the NSE Content of the Hippocampus after Ischemia/Reperfusion Injury Following Focal Cerebral Ischemia in Rat

车玉琴¹, 沈京连¹, 刁尧², 高杰²

CHE Yu-qin¹, SHEN Jing-lian¹, DIAO Yao², GAO Jie²

(1. 中国医科大学附属第四医院, 辽宁沈阳 110005; 2. 中国医科大学附属第一医院, 辽宁沈阳 110005)

(1. The Fourth Affiliated Hospital, China Medical University, Liaoning, Shenyang, 110005, China; 2. The First Affiliated Hospital, China Medical University, Liaoning, Shenyang, 110005, China)

摘要:为了观察胰岛素样生长因子-Ⅱ(IGF-Ⅱ)对大鼠局灶性脑缺血再灌注不同时期海马皮层神经元特异性烯醇化酶(NSE)含量变化的影响,应用线栓法建立大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型,将44只健康 Sprague-Dawley(SD)大鼠随机分为假手术组($n=4$)、缺血再灌注组和 IGF-Ⅱ组。缺血再灌注组于脑缺血2h后根据再灌注不同时间(12h、24h、48h、72h、96h)分为5个亚组(每亚组4只);IGF-Ⅱ组于脑缺血2h侧脑室内注射 IGF-Ⅱ 10 μg 后也根据再灌注不同时间(12h、24h、48h、72h、96h)分为5个亚组(每亚组4只)。于各时间点处死大鼠,并采用酶联免疫分析法测定每只鼠缺血侧海马皮层 NSE 含量。结果显示,缺血再灌注12h和24h组缺血侧海马皮层 NSE 含量较假手术组明显下降($P<0.01$),48h和72h组也有明显下降,但($P<0.05$),96h组基本恢复到假手术组水平;脑缺血2h侧脑室内注射 IGF-Ⅱ 10 μg 后再灌注,48h和72h组与相应时间点缺血再灌注组比较明显上升($P<0.05$),96h组基本恢复到假手术组水平。IGF-Ⅱ组 NSE 含量恢复比同时间点缺血再灌注组快,IGF-Ⅱ可能具有减轻缺血性脑损伤的作用。

关键词:胰岛素样生长因子-Ⅱ 大鼠 脑缺血再灌注损伤 酶联免疫分析法

中图分类号:R729 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2007)02-0137-03

Abstract: To examine the influence of insulin-like growth factor-Ⅱ expression (IGF-Ⅱ) on the alteration of neuron-specific enolase (NSE) in the hippocampal neurons after ischemia/reperfusion following cerebral ischemia in rats. Method: Sprague-Dawley rats were subjected to 2 h of middle cerebral artery occlusion (MACO) by suture blockade and then reperfusion. 44 rats were used in this study, they are sham rats ($n=4$), ischemia/reperfusion rats ($n=20$), and ischemia/reperfusion with IGF-Ⅱ treated rats ($n=20$). Ischemia/reperfusion and ischemia/reperfusion with IGF-Ⅱ treated rats were further divided into 5 sub-groups (4 rats each), 12h, 24h, 48h, 72h and 96h following reperfusion. IGF-Ⅱ treated rats were given IGF-Ⅱ 10 μg by lateral ventricle injection at 2h post-MACO. The NSE content in hippocampus of ischemia side was examined by enzyme-linked immunosorbent assay. Results: so that, (1) The hippocampal NSE content was significantly reduced in ischemia/reperfusion injury rats compared to that in sham rats at 12h, 24h ($P<0.01$), 48h and 72h ($P<0.05$), the NSE content returned to the level of sham rats at 96h. (2) At 48h and 72h post-ischemia/reperfusion injury, the IGF-Ⅱ increased the NSE content in ischemia/reperfusion injured hippocampus ($P<0.05$) compared to those of ischemia/reperfusion injury without IGF-Ⅱ treatment. The NSE content returned to the level of sham rats at 96h after ischemia/reperfusion injury with IGF-Ⅱ treatment. Conclusion: IGF-Ⅱ treatment accelerates the NSE recovery in hippocampus after ischemia/reperfusion injury. The

收稿日期: 2006-12-11

作者简介: 车玉琴(1964-), 女, 副主任医师, 主要从事脑血管疾病治疗和研究工作。

results suggest that the IGF- II has a beneficial effect on ischemia/reperfusion injury after focal cerebral ischemia in rats.

Key words: insulin-like growth factor- II, rat, ischemia/reperfusion injury, enzymelinked immunosorbent assay

神经元特异性烯醇化酶 (Neuron-specific enolase, NSE) 在脑内占脑全部可溶性蛋白的 1.5%, 比例很高。近年来, 基础与临床研究一致认为 NSE 是脑缺血损伤最灵敏、意义最大的指标^[1]。胰岛素样生长因子- II (insulin-like growth- II, IGF- II) 是含 67 个氨基酸的多肽。脑缺血缺氧损伤后, 大脑出现多种神经营养因子表达增加, 其中就包括 IGF- II, 这提示 IGF- II 在脑缺血损伤中起保护作用^[2]。本实验建立大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型, 观测外源性 IGF- II 对脑缺血再灌注不同时期 NSE 表达的影响, 旨在 IGF- II 作为神经保护剂应用于临床奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠 (由中国医科大学实验动物中心提供) 44 只, 体重 260~320g, 标准环境饲养。假手术组 ($n=4$); 非用药组 ($n=20$) 即缺血 2h 后注射生理盐水进行再灌注 12h ($n=4$)、24h ($n=4$)、72h ($n=4$)、96h ($n=4$); 用药组 ($n=20$) 即缺血 2h 后注射 IGF- II $10\mu\text{g}$ 进行再灌注 12h ($n=4$)、24h ($n=4$)、72h ($n=4$)、96h ($n=4$)。

1.2 大鼠大脑中动脉闭塞模型的建立

参照曹勇军等^[3]改进的 Longa 线栓法, 将大鼠经 80g/水合氯醛 (300mg/kg, 腹腔注射) 常规麻醉, 在左侧颈内和颈外动脉交叉处剪一小口插入尼龙线约 (19 ± 0.5) mm, 遇到阻力时停止, 此时可闭塞大脑中动脉起始部。2h 后拔出尼龙线, 进行再灌注, 同时在脑定位仪上进行右侧脑室定位, 在前凶右侧 1.8 mm, 后 0.8 mm, 即右侧脑室钻孔, 深度 4.0~5.0 mm 进针, 用药组注射 IGF- II $10\mu\text{g}$ (美国 Sigma 公司提

表 1 IGF- II 对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑皮质 NSE 含量变化

Table 1 IGF- II influence on the alteration of NSE in the hippocampal neurons after ischemia/reperfusion following focal cerebral ischemia in rats

组别 Group	NSE 含量 NSE content ($\bar{x} \pm s$)				
	12h	24h	48h	72h	96h
假手术组 False operation groups ($n=4$)	14.26 \pm 0.59				
非用药组 Non-medicine groups ($n=20$)	4.41 \pm 0.48**	3.69 \pm 0.61**	7.28 \pm 0.75*	8.23 \pm 0.59*	13.96 \pm 0.56
用药组 Medicine groups ($n=20$)	5.05 \pm 0.63	4.08 \pm 0.39	10.28 \pm 0.75 Δ	11.07 \pm 0.62 Δ	14.08 \pm 0.49

非用药组与假手术组比较, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$; 用药组与非用药组比较, $\Delta P < 0.05$ 。
Comparison between non-medicine groups and false operation groups. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$; Comparison between medicine groups and non-medicine groups, $\Delta P < 0.05$.

供), 非用药组注射 1ml 生理盐水, 20min 内注射完毕, 拔出针头, 海绵胶止血, 缝合, 关笼饲养。大鼠苏醒后出现对侧肢体功能障碍为模型成功标准。假手术组除不插入线栓及侧脑室注射外, 其他的操作步骤同上。

1.3 样本采集

全部大鼠按预定时间处死, 取出左侧大脑半球, 并立即去除蛛网膜及血管, 称取海马区大脑皮层组织 800~1000mg, 放入 3 倍脑组织体积的缓冲液 (含 1mmol/L MgSO_4 , 10 mmol/L Tris 磷酸, pH 值 7.4) 中备用, 脑组织剪碎后用玻璃匀浆器手工匀浆, 并用 15000rps/min 离心 1h, 取上清液, 稀释至 1:100。

1.4 NSE 检测

采用神经元特异性烯醇化酶酶联免疫分析法测定 NSE, 试剂盒由海南生物制品厂提供, 操作按说明书进行。

1.5 统计学方法

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS8.0 统计软件进行组间均数比较, 并进行 t 检验和方差分析。

2 结果

缺血再灌注 12h 和 24h 组缺血侧海马皮层 NSE 含量较假手术组明显下降 ($P < 0.01$), 48h 和 72h 组也有明显下降 ($P < 0.05$), 96h 组基本恢复到假手术组水平。脑缺血 2h 侧脑室内注射 IGF- II $10\mu\text{g}$ 后再灌注 12h 和 24h 组的缺血侧海马皮层 NSE 含量与相应时间点缺血再灌注组比较无统计学意义 ($P > 0.05$), 48h 和 72h 组与相应时间点缺血再灌注组比较明显上升 ($P < 0.05$), 96h 组基本恢复到假手术组水平。详见表 1。

3 讨论

NSE 是普遍存在于生物体内的糖酵解代谢酶,它催化中间产物磷酸烯醇化丙酮酸的生成。目前自然界中共有 5 种烯醇化酶的同功酶,分别是 $\alpha\alpha$ 型, $\beta\beta$ 型, $\gamma\gamma$ 型, $\alpha\beta$ 型和 $\alpha\gamma$ 型,其中 $\gamma\gamma$ 型特异性存在于神经细胞和神经内分泌细胞内,故又称之为神经元特异性烯醇化酶(NSE),它是神经元损伤的标志酶。文献[4]研究发现,在脑缺血后蛋白合成明显受到抑制,全脑缺血处理 5min 后 48 h 海马 CA1 区神经元 NSE 的 mRNA 水平下降 38%,此种持续性的蛋白合成抑制与进行性的细胞损伤密切相关,随着缺氧、缺血的改善,细胞功能会发生不同程度的修复,再加上细胞的代偿作用,使脑组织的 NSE 水平会逐渐上升。本次研究结果显示,缺血再灌注 12h 和 24h 组缺血侧海马皮层 NSE 含量较假手术组明显下降($P < 0.01$),96h 组基本恢复到假手术组水平。

胰岛素样生长因子包括 IGF- I、IGF- II 和胰岛素等肽类激素。动物实验已证实 IGF- II 除了具有神经营养因子外,还具有多向性,可作为细胞增值及分化因子,是鼠脑生长发育必须的一种因子^[2]。在脑缺血卒中后,胰岛素样生长因子的营养及保护作用被众多实验所肯定。缺血前预处置,可使鼠脑缺血区凋亡细胞数减少,梗死面积缩小^[2]。本研究结果显示,脑缺血 2h 侧脑室内注射 IGF- II 10 μ g 后再灌注 48h 和 72h 组与相应时间点缺血再灌注组比较明显上升($P < 0.05$),96h 组基本恢复到假手术组水平。这说明应用外源性 IGF- II 可能具有改善脑缺血损伤的作用。其作用途径可能通过以下几种^[5]:(1)降低血糖浓度,减轻乳酸酸中毒;(2)提高缺血区 γ -氨基丁酸的水

平;(3)通过减少 P53 基因介导的细胞凋亡,阻止受损细胞死亡;(4)促进红细胞生成素的生成;(5)促进肾上腺皮质激素分泌保护脑细胞;(6)增强鸟氨酸脱羧酶活性和稳定细胞膜;(7)诱导真核启动子 2 α 脱磷酸、恢复蛋白合成。

总之,本实验进一步阐明了 IGF- II 在脑缺血缺氧损伤中具有神经元保护作用。目前 IGF- II 的神经保护作用仍处于动物实验阶段。随着临床实验的开展,IGF- II 有可能作为脑保护剂应用于脑血管病的治疗。

参考文献:

- [1] WOERTGEN C, ROTHOERL R D, BRAWANSKI A. Neuron-specific enolase serum levels after controlled cortical impact injury in the rat [J]. J Neurotrauma, 2001, 18: 569-573.
- [2] HIRAI A, NAKANISHI R. Solitary fibrous tumor of the pleura with hypoglycemia associated with serum insulin-like growth factor II [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2006, 132(3): 713-714.
- [3] 曹勇军, 程彦斌. 线栓法建立大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的改进与探讨[J]. 中国应用生理学杂志, 2001, 17: 198-200.
- [4] ZHANG M, MA Y F, GAN J X, et al. Basic fibroblast growth factor alleviates brain injury following global ischemia reperfusion in rabbits [J]. Zhejiang Univ Sci B, 2005, 6(7): 637-643.
- [5] 席刚, 田志岩, 张春时. 胰岛素及其生长因子对缺血性脑损伤的保护作用[J]. 医学综述, 2003, 9(12): 757-759.

(责任编辑:邓大玉)

本世纪甲烷不太可能大量释放

德国科学家在重新研究全球变暖而造成的北极永久冻结带融化状况之后表示:在本世纪不太可能发生甲烷大量释放的现象。

随着地球气候变暖,永久冻结带将持续融化,原本被包裹在冰冻状态的沉积物中的甲烷可能会溢散到大气中。甲烷是一种温室气体,可能会加剧全球变暖。曾经有科学家在 2005 年末利用一个永久冻结带模型预测 21 世纪北极近表层的永久冻结带将会完全融化。然而,德国联邦地球科学和天然资源研究所的 Georg Delisle 及其同事们则开发了一个更精确的数学模型。利用这个新模型,德国科学家准确表达了永久冻结带的物理过程。并认为不久的将来永久冻结带完全融化、甲烷大量释放的观点是不可信的。

(据科学网)